

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03871

研究課題名（和文）歯科治療にパラダイムシフトをもたらすスマート・バイオアクティブマテリアルの創製

研究課題名（英文）Development of smart-bioactive materials beneficial for a paradigm shift in dental treatment

研究代表者

今里 聡（Imazato, Satoshi）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：80243244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔環境や病態の変化に対応してバイオアクティブな機能を発揮するスマート・マテリアルの創製を目指して、2つのコンセプトに基づいたバイオアクティブガラスを試作し、各ガラスの物理・化学的特性や細菌・細胞に対する作用を検討した。その結果、亜鉛及びガリウム徐放ガラスを組み合わせることで、pH変化に伴うイオン徐放の制御により、う蝕あるいは歯周病に関連する細菌に対して特異的な抗菌効果を発揮させ得ることが明らかとなった。また、リチウム及びストロンチウム徐放ガラスを組み合わせることで、ガラスの溶解速度の差を利用して、抗炎症作用及び硬組織誘導効果を段階的に発現可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、古くから、歯科用修復材料へのバイオアクティブ機能の付与という概念を発信してきた。その成果もあり、近年、国内外でバイオアクティブな歯科材料に関する研究が数多く行われるようになってきた。しかし、それらの研究の多くは、細菌や細胞に対する特定の作用を持続的に発揮させることを狙ったものである。本研究により、口腔環境や病態の変化に対応してバイオアクティブな機能を発揮する技術を確立できたことで、適切な時期に適切な活性成分を作用させるさまざまな歯科材料の開発が可能となると期待される。

研究成果の概要（英文）：Aiming at development of smart-bioactive materials that exhibit the functions in response to environmental changes or according to the stage of tissue healing, we fabricated novel bioactive glasses and evaluated their physico-chemical properties and effects on bacteria and cells. Based on the material design to achieve controlled release under different pH, combination of zinc- and gallium-releasing glasses exhibit the antibacterial activities against bacteria related with dental caries or periodontal disease in response to pH. It was also shown that the combination of lithium- and strontium-releasing glasses demonstrated the effects to suppress inflammation and promote regeneration sequentially by their different biodegradability.

研究分野：口腔再生医学および歯科医用工学関連

キーワード：歯学 歯科材料学 生体材料学 スマート・マテリアル ガラス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、抗菌性に代表されるバイオアクティブな作用を各種歯科材料に付与する試みが盛んに行われるようになってきた。研究代表者らは、古くからレジン系材料への抗菌性付与に関する研究を推進し、まず世界初の抗菌性モノマーMDPBを開発して、薬剤の溶出に依存しない接触型の抗菌効果を歯科用レジンに付与するという独自のアイデアを世界に先駆けて発信した。さらに、薬剤溶出型のアプローチとして、新規に開発した非生体分解性ポリマー粒子に成長因子や抗菌剤を担持させ、組織再生誘導能や抗菌剤の長期徐放能を備えた歯科用レジンを実現する技術を確立した。しかしながら、抗菌性モノマーや薬剤徐放用キャリアの利用を始めとするこれまでのアプローチは、活性成分の作用を持続的に発現させることを狙ったコンセプトであり、口腔環境や病態の変化に追従して適切な時期に適切な活性成分を作用させるまでの考えには至っていない。さらに、持続的な作用発現による必要十分以上の抗菌効果の発現は、口腔環境の恒常性維持の点で望ましいとは言い難い。このような点を踏まえ、歯科材料が外部環境の変化に応答して、あるいは病態のステージに応じて適切なバイオアクティブ機能を発揮することができれば、疾患の発症や進行をより効果的かつ安全に制御するうえで有益ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、口腔環境や病態の変化に応答してバイオアクティブな機能を発揮するスマート・マテリアルの創製を目指して、2つのコンセプトに基づいた新しいバイオアクティブガラスを開発することを目的とした。具体的には、pHの変化によってイオン溶出が制御される環境応答型ガラスとして、抗菌性を有するZnやGaを含むケイ酸塩系ガラスを試作した。一方、溶解速度の差を利用して抗炎症作用と硬組織誘導効果を段階的に発現する病態応答型ガラスとして、抗炎症作用を示すLiや硬組織形成を誘導するSrを含むリン酸塩系ガラスを試作した。そして、各ガラスの物理・化学的特性や細菌および細胞に対する作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) 各種ガラスの作製

表1および表2に示す原料をもとに環境応答型および病態応答型ガラスを作製し、平均粒径が約10 μ mとなるように粉碎した。作製した各ガラス粒子を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察し、エネルギー分散型X線分光法(EDS)により組成を解析した。

(2) 溶解性およびイオン溶出性の評価

環境応答型ガラス

各ガラス粒子をpH7.4、6.1、または5.1に調製した細菌培養用培地に24時間浸漬した後、重量変化を測定して溶解率を算出した。さらに、得られた溶出液中のイオン濃度をICP発光分光分析装置を用いて測定した。

病態応答型ガラス

各ガラス粒子を蒸留水に浸漬し、1、3、7、15、30、50、75、および100日後に蒸留水を交換しながら重量変化を測定して溶解率を算出した。さらに、得られた溶出液中のイオン濃度をICP発光分光分析装置を用いて測定した。

(3) ガラスの機能解析

環境応答型ガラスの細菌に対する作用

各ガラス粒子、あるいは各ガラスを等量ずつ混和したガラス粒子をpH7.4、pH6.1、あるいはpH5.1に調製した *Streptococcus mutans* NCTC10449 あるいは *Porphyromonas gingivalis* W83 の各菌液に浸漬し、24時間培養後に生菌数を測定した。

病態応答型ガラスの細胞に対する作用

各ガラス粒子を細胞培養用培地に24時間浸漬し、得られた培養上清の存在下でマクロファージ(RAW264)あるいは骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を培養し、細胞毒性を評価した。

Li徐放ガラスについては、LPSおよびIFN γ で刺激したマクロファージをガラス粒子の存在下で7日間まで培養後、一酸化窒素およびIL-6の産生量を測定し、リアルタイムPCRによりNos2、CD86、CD80の発現を検討した。

Sr徐放ガラスに関しては、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BMSCs)をガラスの存在下で7日間まで培養し、細胞増殖試験を行った。さらに、培養7、14日目にアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、およびリアルタイムPCR法により骨分化マーカーの発現量を評価し、培養28日目にvon Kossa染色を行い、Sr徐放ガラスの骨分化に及ぼす影響を検討した。

表1 環境応答型ガラスの原料および仕込み比(mol%)

	Zn徐放ガラス	Ga徐放ガラス
SiO ₂	30.5	0
P ₂ O ₅	0	55.0
Na ₂ O	5.0	31.0
ZnO	38.2	0
Al ₂ O ₃	0	4.0
Ga ₂ O ₃	0	10.0
F	18.7	0

表2 病態応答型ガラスの原料および仕込み比(mol%)

	Li徐放ガラス	Sr徐放ガラス
P ₂ O ₅	42.0	45.0
Li ₂ O	40.0	0
SrO	0	35.0
Na ₂ O	0	14.0
CaO	16.0	0
Al ₂ O ₃	2.0	6.0

4. 研究成果

(1) 各種ガラスの作製

環境応答型として、Zn を含むケイ酸塩系ガラスと Ga を含むリン酸塩系ガラスを作製した (図 1)。一方、病態応答型として、Li あるいは Sr を含むリン酸塩系ガラスを作製した。

作製したガラス粒子はいずれも約 11 μm の不定形で、各元素がガラス内に均一に分散されていることを確認した。

(2) 各ガラスの溶解性およびイオン溶出性の評価

環境応答型ガラス

Zn 徐放ガラスの溶解率は、ガラスを浸漬した溶液の pH が低下するに従って有意に増加した (図 2)。また、pH 低下に伴う溶解率の増加により、Zn 溶出濃度が有意に増加した。一方、Ga 徐放ガラスについては、pH7.4 の条件下での溶解率および Ga 溶出濃度が最も高かった。

病態応答型ガラス

Li 徐放ガラスは、7 日間蒸留水に浸漬することで 99.9% 溶解したのに対して、Sr 徐放ガラスは 100 日間経過後も 58% のガラスが残存することが分かった。ガラスの溶解に伴い、Li 徐放ガラスは 14 日間 Li イオンを溶出したのに対して、Sr 徐放ガラスは 100 日間 Sr の溶出が持続することが明らかとなった。

(3) ガラスの機能解析

環境応答型ガラスの細菌に対する作用

Zn 徐放ガラスの存在下で pH7.4、pH6.1、あるいは pH5.1 に調製した *S. mutans* の菌液を培養したところ、菌液の pH の低下にとともに、有意に *S. mutans* に対する抑制効果が大きくなることが分かった。一方、Ga 徐放ガラスの存在下で *P. gingivalis* の菌液 (pH7.4) を培養したところ、生菌数が減少することが分かった。さらに、Zn 徐放および Ga 徐放ガラスを等量ずつ混和したガラスの存在下で各菌液を培養した結果、菌液の pH が低い条件下では *S. mutans* を抑制したのに対して、中性 pH の条件下では *P. gingivalis* に対して抗菌効果を発揮することが示された。

病態応答型ガラスの細胞に対する作用

Li 徐放ガラスは RAW264 および MC3T3-E1 に対して、Sr 徐放ガラスは MC3T3-E1 に対して細胞毒性を示さないことが確認された。

また、Li 徐放ガラスの存在下で LPS および IFN で刺激した RAW264 を 1~7 日間培養したところ、ガラス非存在下に比べて、一酸化窒素および IL-6 の産生量が低下することが分かった。同様の培養条件で、M1 型マクロファージのマーカーである Nos2、CD86、CD80 の発現を検討したところ、いずれのマーカーの発現も Li 徐放ガラスの存在下で抑制されることが分かった。すなわち、溶解速度の速い Li 徐放ガラスは培養 7 日間で炎症を抑制する作用を発揮できることが明らかとなった。

一方、Sr 徐放ガラスの存在下で BMSCs を培養した

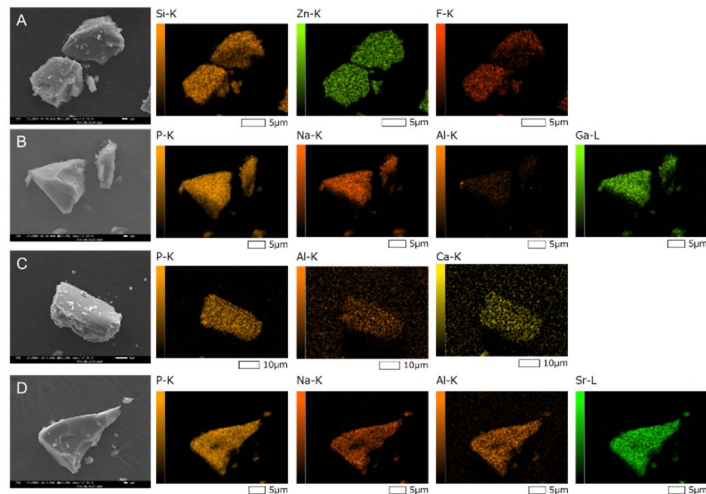


図 1. 作製した各ガラスの SEM および EDS マッピング像。A: Zn 徐放ガラス。B: Ga 徐放ガラス。C: Li 徐放ガラス。D: Sr 徐放ガラス。

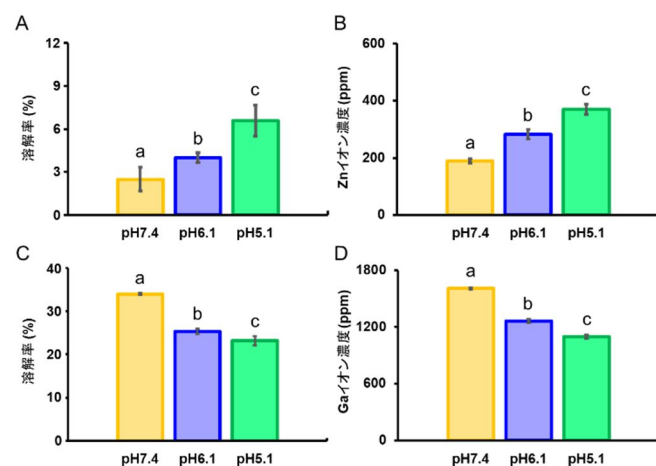


図 2. 環境応答型ガラスの溶解率およびイオン溶出性。A: Zn 徐放ガラスの溶解率。B: Zn 徐放ガラスの Zn 溶出性。C: Ga 徐放ガラスの溶解率。D: Ga 徐放ガラスの Ga 溶出性。a, b, c: 異なる文字間に有意差を認める ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey's HSD test)

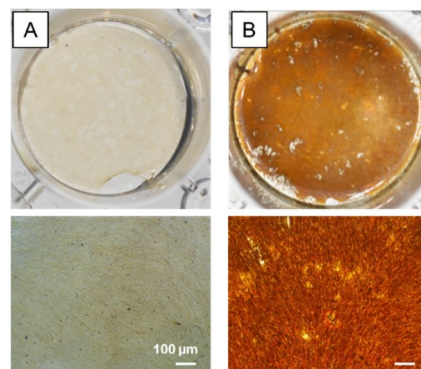


図 3. BMSCs による石灰化基質産生。A: ガラス非存在下。B: ストロンチウム徐放ガラス存在下。

結果、Sr 徐放ガラスは BMSCs の増殖に影響を与えないことが分かった。一方、Sr 徐放ガラスと共に培養した BMSCs は、培養 7 日目、14 日目ともに、ガラス非存在下で培養した BMSCs に比べて高い ALP 活性を示した。また、リアルタイム PCR 法の結果から、Sr 徐放ガラスと培養することで、Runx2 や OPG といった骨分化マーカーの発現量が増加し、培養 28 日目での von Kossa 染色による評価により石灰化基質の沈着が認められた(図 3)。すなわち、緩徐な溶解により Sr を長期徐放するガラスは、骨分化を促進する作用を示すことが確認された。

以上のように、本研究により、Zn および Ga 徐放ガラスを組み合わせることで、pH 変化に伴うイオン徐放の制御により、*S. mutans* および *P. gingivalis* に対して特異的な抗菌効果を発現させ得ることが明らかとなった。また、短期間で溶解して Li を溶出する Li 徐放ガラスと、緩徐な溶解により Sr を長期徐放できる Sr 徐放ガラスを組み合わせることで、抗炎症作用および硬組織誘導効果を段階的に発現できる技術を確立できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Liu YH, Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S	4. 巻 39
2. 論文標題 Acidity-induced release of zinc ion from BioUnion filler and its inhibitory effects against Streptococcus mutans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 547 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2019-061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kohno T, Liu YH, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S	4. 巻 37
2. 論文標題 Evaluation of ion release and the recharge ability of glass-ionomer cement containing BioUnion filler using an in vitro saliva-drop setting assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 882 ~ 893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dental.2021.02.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu YH, Kohno T, Tsuboi R, Thongthai P, Deng F, Sakai H, Kitagawa H, Imazato S	4. 巻 40
2. 論文標題 Antibacterial effects and physical properties of a glass ionomer cement containing BioUnion filler with acidity-induced ability to release zinc ion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 1418 ~ 1427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2021-052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kohno T, Kitagawa H, Tsuboi R, Nishimura Y, Imazato S	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishment of novel in vitro culture system with the ability to reproduce oral biofilm formation on dental materials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00803-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Deng F, Sakai H, Kitagawa H, Kohno T, Thongthai P, Liu YH, Kitagawa R, Abe G, Sasaki JH, Imazato S	4. 巻 27
2. 論文標題 Fabrication of pH-responsive Zn-releasing glass particles for smart antibacterial restoratives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 7202 ~ 7202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27217202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 今里 聡
2. 発表標題 産学連携にもとづくクラス 修復材料の開発と実用化
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会 (第152回) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神野友樹, 壺井莉理子, 北川晴朗, 今里 聡
2. 発表標題 カプセル練和型ガラスアイオノマーセメントの抗菌性・抗バイオフィルム効果
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会 (第152回)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohno T, Liu YH, Deng F, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S
2. 発表標題 Evaluation of anti-biofilm effects of bio-active GIC using a bioreactor
3. 学会等名 第68回国際歯科研究学会日本部会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Liu YH, Kohno T, Tsuboi R, Thongthai P, Deng F, Sakai H, Kitagawa H, Imazato S
2. 発表標題 Antibacterial effects of BioUnion filler-incorporated GIC with acidity-induced zinc-releasing ability
3. 学会等名 99th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今里 聡
2. 発表標題 次世代型歯科用バイオアクティブマテリアルの開発
3. 学会等名 第78回日本歯科理工学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Liu YH, Kitagawa H, Kohno T, Tsuboi R, Thongthai P, Deng F, Sakai H, Imazato S
2. 発表標題 In situ assessments of antibacterial effects of Zn-releasing glass-ionomer cement
3. 学会等名 2022 International Association for Dental Research General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Deng F, Sakai H, Kitagawa H, Kohno T, Tsuboi R, Thongthai P, Liu YH, Imazato S
2. 発表標題 Fabrication of pH-responsive Zn-releasing glass particles for smart antibacterial restoratives
3. 学会等名 2022 International Association for Dental Research General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Abe G, Sakai H, Kitagawa H, Kohno T, Xiao L, Sasaki JI, Imazato S
2. 発表標題 Fabrication of a lithium-releasing phosphate-based bioactive glass
3. 学会等名 International Dental Materials Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sakai H, Deng F, Sasaki JI, Kitagawa H, Kohno T, Abe G, Xiao L, Imazato S
2. 発表標題 Characterization of a strontium-releasing phosphate-based bioactive glass for bone regeneration
3. 学会等名 International Dental Materials Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北川 晴朗 (Kitagawa Haruaki) (50736246)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	佐々木 淳一 (Sasaki Jun-ichi) (50530490)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師 (14401)	
研究分担者	岩崎 泰彦 (Iwasaki Yasuhiko) (90280990)	関西大学・化学生命工学部・教授 (34416)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	壺井 莉理子 (Tsuboi Ririko) (20827430)	大阪大学・大学院歯学研究科・特任助教（常勤） (14401)	削除：2021年10月29日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関